



GENETIKA ÉS PREVENCIÓ A GYERMEK- HEMATOONKOLÓGIÁBAN

PhD értekezés tézisei

dr. Gábor Krisztina Mita

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Gyermekegyógyászati Klinika

Szeged
2017

GENETIKA ÉS PREVENCIÓ A GYERMEK- HEMATOONKOLÓGIÁBAN

PhD értekezés tézisei

dr. Gábor Krisztina Míta

Témavezető: dr. Bereczki Csaba PhD

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Gyermekegyógyászati Klinika

Szeged
2017

ÖSSZEFOGLALÁS

BEVEZETÉS: A gyermekhematookológiában egyre nő a prevenció szerepe, melynek fejlődését a mélyülő genetikai ismereteink nagyban segíthetik.

A cytosine arabinoside (1- β -D-arabinofuranozicitozin, citarabin, ara-C) a gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) kezelésének egyik fontos gyógyszere. Az általa okozott mellékhatások jelentősek lehetnek, és problémát okozhatnak a kezelés során. A toxicitás mértéke egyénenként eltérő lehet, ennek egyik oka a genetikai változatosságban, ezen belül az egy pontos nukleotid polimorfizmusokban (SNPs - single nucleotide polymorphisms) kereshető.

A Rothmund-Thomson szindróma (RTS) és a Rubinstein-Taybi szindróma (RSTS) ritkán előforduló genetikai megbetegedések, típusos megjelenéssel és fokozott malignitási hajlammal. RTS-ban a *RECQL4* gén mutációi vezetnek a genom instabilitásához, RSTS-ben a *CREBBP* és a *EP300* gén elváltozási állnak a betegség kialakulásának hátterében.

CÉLKITÜZÉS: Vizsgálni az ara-C metabolizmusban szerepet játszó transzportmolekulákat és enzimeket kódoló gének polimorfizmusainak hatását az ara-C okozta toxicitásra és a gyermekkori ALL túlélésére.

Azonosítani RSTS-s betegünk genetikai hátterét prevenció és prognosztikai céllal. Felhívni a figyelmet két esetünk alapján a malignitási hajlammal járó betegségek esetében a diagnózis és megfelelő követés fontosságára, a legjobb ellátás és legkedvezőbb kimenetel érdekében.

BETEGEK és MÓDSZER: A *CDA*, *DCK*, *DCTD*, *SLC28A3* és *SLC29A1* gének 8 SNP-jét vizsgáltuk 144 ALL-es gyermek DNS mintáiban. A gyermekek az ALL-BFM 1990 és 1995 és ALL IC-BFM 2002 protokollok részeként kapták az ara-C kezelést. Esettanulmány 1. Egy születését követően nem sokkal diagnosztizált RTS -s lány, akinek három éves korában kután limfómája alakult ki. Esettanulmány 2. Egy négy éves korában diagnosztizált RST s fiú, akinél 6 éves korában medulloblastoma igazolódott.

EREDMÉNYEK: A *DCK* rs12648166 és *DCK* rs4694362 génpolimorfizmusok összefüggést mutattak az ara-C terápia következményeként fellépő leukopéniában állól, genotípus és haplotípus szinten egyaránt. Esettanulmány 1. Elsőként mutattunk be RST-asszociált bifenotípusú, biklonális, EBV asszociált kután limfómát, emellett ebben a korai életkorban még nem írtak le korábban RTS asszociált limfómát. Az elmaradt kontrollok és elmulasztott napvédelem szerepet játszhatott a beteg korai halálában. Esettanulmány 2. Egy eddig nem publikált *CREBBP* mutációt azonosítottunk RSTS-es betegünkénél. A rendszeres, célzott gondozás alatt álló fiúnál a medulloblastoma korai diagnózisa és sikeres kezelése történt.

KONKLÚZIÓK: 1. A toxicitás genetikai hátterének megismerése személyre szabott terápia tervezését teheti lehetővé az egyének megelőző genetikai vizsgálatával. 2. Korai életkorban is gondolni kell RTS-ben limfómára. Bifenotípusú, bigenotípusú, EBV asszociált kután limfóma is társulhat ezen szindrómához. 3. A malignitásra hajlamosító genetikai szindrómás betegek gondozása nagy jelentőséggel bír, különösen fontos a korai diagnózis, mely lehetővé teszi, hogy prediktív orvoslással a betegeket a várható tüneteknek, fellépő tumoroknak és prognózisnak ismeretében prevencióban illetve a legjobb ellátásban részesíthessük. A genetikai háttér igazolása alátámasztja a diagnózist, pontosíthatja a tumorkockázatot, a prognózist és segítséget nyújthat a családtervezés terén.

BEVEZETÉS

A preventív medicina genetikai lehetőségei egyre bővülnek. A betegségek genetikai hátterének ismerete a malignitások kifejlődésének megelőzésében, a prediktív gondozásban, farmakogenetikai ismereteink bővülése pedig a terápia individualizálása által, például a gyógyszertoxicitások csökkentésében bírhat fontos szereppel.

1. Ara-C farmakogenetikai vizsgálat

A daganatellenes terápiák individualizálásával, a beteg egyéni jellemzőinek figyelembe vételével személyre szabható a gyógyszeradagolás, ezáltal a mellékhatások csökkentése, a túlélés javítása válhat elérhetővé. Ennek egy lehetősége az alkalmazott citosztatikumok farmanogenetikai variációjának megismerése.

Az akut limfoid leukémia (ALL) a leggyakoribb hematológiai malignitás gyermekekben, Magyarországon évente 50-70 új megbetegedést diagnosztizálnak. Az ALL IC-BFM protokollhoz csatlakozva, kombinált kemoterápiával a gyógyulás hazánkban is jelentős, az 5 éves túlélés 85%.

Az alkalmazott kemoterapeutikumok toxikusak, súlyos mellékhatásokat okozhatnak, rapidan életet veszélyeztető állapothoz vezethetnek, rontják az életminőséget. A toxicitás miatt a kezelés megszakítására kényszerülhetünk, csökkentve ezáltal a kezelés hatékonyságát és növelve a relapsus kockázatát.

A nukleozid-analog citarabin az ALL kezelésének fontos eleme. Főbb mellékhatásai standard dózis esetén: mieloszuppresszió és ennek következményei: fertőzés és vérzés a fehérvérsejt- és trombocitacsökkenés miatt. A mellékhatások mértéke egyénenként igen eltérő, ennek egy része genetikai okokkal magyarázható. Megismerve a beteg genetikai hátterét lehetőség nyílik kezelés előtti genetikai vizsgálattal a veszélyeztetett betegek kiszűrésére, a gyógyszeradagolás személyre szabott meghatározására. Az ara-C transzportjában és metabolizmusában résztvevő gének változékonysága jelentős szereppel bírhat az egyéni érzékenységekben és emellett a túlélésben is.

Számos vizsgálat igazolta a nukleozid típusú gyógyszerek metabolizmusában részt vevő SNP-k szerepét a pirimidin hatóanyagok farmakokinetikai és farmakodinamikai variabilitásának hátterében. Tanulmányunkban 5 gén /*CDA* (citidin deamináz), *DCK* (deoxycitidin kináz), *DCTD* (deoxycitidin-monofoszfát deamináz), *SLC28A3* (solute carrier family 28 member 3) és *SLC29A* (solute carrier family 29 member 1)/ 8 SNP-jét vizsgáltuk.

Az ara-C degradáció legfontosabb enzime a CDA. Korábbi kutatásokban összefüggést igazolódott a G208A, A79C, A76C és C111T polimorfizmusok és az enzim szintje ill. a toxicitás között, míg más tanulmányok nem találtak kapcsolatot az

T435C, G208A és A76C SNP-k esetében. A DCK kulcsszerepet játszik a nukleozid analógok lebontásában, katalizálja az ara-C – ara-CMP átalakulást. Alacsonyabb DCK-szint korrelál az ara-C rezisztenciával és vizsgálatok sora igazolta egyes SNP-k (I24V, A119G 2, P122S, 35708 C<T) befolyását a toxicitásra. A DCTD szintén a pirimidin inaktiváció fontos eleme, a *DCTD* T47C SNP hatását mutatták ki a túlélésre. Az ara-C sejtbe való bejutásáért felelős transzporterfehérjékhez tartozó SNP-k szintén jelentősek a gyógyszer hatásának változékonyságában, az *SLC29A1* C1345G, G1050A, T-549C, G706C, A201G; *SLC28A3* A25G és C-69T SNP-k korábbi vizsgálatokban befolyásolták a toxicitást és túlélést.

2. Ritka genetikai megbetegedések malignizálódási hajlammal

Malignus hajlammal járó genetikai betegségekben a korai diagnózis és a gondos utánkövetés, különös tekintettel a megelőzhető daganatok kivédésére és a malignitások legelső jeleinek észrevételére elengedhetetlen. A lehetőségeink szerint elvégzett genetikai vizsgálat megadhatja vagy megerősítheti a diagnózist, pontosabb prognózist és prediktív gondozást tesz lehetővé, támpontot adhat családtervezés esetén.

A Rothmund-Thomson szindróma (RTS) egy ritka genetikai betegség, karakterisztikus megjelenéssel: csonteltérés (radius, ulna, patella és pollux aplázia), alacsony termet, gyér szőrzet, szürkehályog, mentális deficiencia jellemző. A beteg fényérzékeny, mely korai poikiloderma kialakulásához vezet. A betegség hátterében a RecQ helikáz géncsalád *RECQL4* gén mutációi állnak: A DNS struktúrája és integritása sérül, a genom instabillá válik. A betegek különösen hajlamosak csontszarkómákra és nonmelanotikus bőrtumorokra. Különböző típusú limfómák és egyéb tumorok szintén előfordulhatnak.

A Rubinstein-Taybi szindróma szintén alacsony előfordulású. Dizmorf arcvonások (kicsi állkapocs és száj zsúfolt fogakkal, gótikus szájpadrás, előreugró orr, homlokra húzódó hajvonal, sűrű haj, antimongoloid szemrés), alacsony termet és intellektus, széles hüvelyk- és nagylábujj, a szív és húgyúti rendszer deformitásai jellemzik. A betegek infekcióra fogékonyak, ez gyakran vezet halláscsökkenéshez. A kórkép hátterében a *CREBBP* és *EP300* gének igen nagyszámú mutációja mutatható ki. A *CREBBP* and *EP300* fehérjék koaktivátor szereppel bírnak a DNS-kötő transzkripciós faktor és az RNS polimerázok között, emellett hiszton-acetiltranszferázként is működnek. A károsodott DNS–RNS átalakulás és hiszton acetilálás a transzkripció kontrolljának zavarához vezet, ezért emelkedett számban alakulnak ki benignus és malignus tumorok, főként keloidok, egyes agytumorok és vérképző rendszeri betegségek.

A VIZSGÁLATOK CÉLJA ÉS ALAPVETŐ KÉRDÉSEI

Célok

1. Összefüggést kimutatni az ara-C transzportjában és metabolizmusában részt vevő molekulák génpolimorfizmusai és az ara-C toxicitás és beteg túlélése között. Nyolc SNP-t vizsgáltunk: *CDA* rs1048977, *DCK* rs12648166 és rs4694362, *DCTD* rs4742, *SLC28A3* rs7853758 és rs7867504 és *SLC29A1* rs9394992 és rs324148. A vizsgált gének variabilitása jelentős szereppel bírhat az intracellularis ara-CTP szintjének alakításában, következményesen a toxicitásban és a túlélésben.
2. Bemutatni egy Rothmund-Thomson szindrómához asszociált bifenotípusú, biklonális EBV-asszociált kután limfómát. Felhívni a figyelmet hogy már korai, három éves életkorban is jelentkezhet limfóma RTS-hez társultan.
3. Bemutatni egy Rubinstein-Taybi szindrómás gyermeket, kinél azonosításra került egy korábban még nem közölt *CREBBP* mutáció, és kinél a gondos utánkövetés során korai tüneteknél diagnosztizáltuk és sikeresen kezeltük a kialakult medulloblasztómát.
4. Hangsúlyozni a korai diagnózis jelentőségét a tumor-asszociált öröklődő betegségek esetén, különös tekintettel a genetikai diagnózisra.
5. Két esetismertetés segítségével átgondolni a célzott, gondos követés fontosságát, hogy időben felismerjük az újabb tünetek s legfőképp a rosszindulatú tumorok kialakulásainak jeleit, adott esetben akár megelőzhessük annak kialakulását.

Kérdések

1. Mutatható-e ki összefüggés a vizsgált SNP-k és a citarabin toxicitás között?
2. Mutatható-e ki összefüggés a vizsgált haplotípusok és a citarabin toxicitás között?
3. Mutatható-e ki összefüggés a vizsgált SNP-k és a gyermekkori ALL túlélése között?
4. Mutatható-e ki összefüggés a vizsgált haplotípusok és a gyermekkori ALL túlélése között?
5. Elérhetünk-e jobb prognózist tumor-asszociált öröklődő szindrómák esetén a betegségek korábbi felismerésével, genetikai vizsgálattal és célzott beteggondozással? Javíthatunk-e a beteg együttműködésén és betegségének lefolyásán átfogóbb betegfelvilágosítással?

BETEGEK ÉS MÓDSZER

1. Ara-C farmakogenetikai vizsgálat

Betegek

A retrospektív vizsgálatba 144 akut limfoid leukémiával 1991 és 2007 között diagnosztizált gyermeket vontunk be. A citosztatikus kezelést az ALL-BFM 1990, 1995 illetve az ALL IC-BFM 2002 nemzetközi protokollok alapján végeztük két magyarországi centrumban: a Szegedi Tudományegyetem Gyermekklinikáján és a budapesti Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekklinikáján. A gyermekek standard, közepes és magas kockázatú csoportokba sorolása a protokollnak megfelelően történt. A társult betegséggel rendelkező betegeket kizártuk a vizsgálatból. A betegeket 5 évig illetve a halál időpontjáig követtük.

Vizsgáltuk az intenzifikációs fázis (Protokoll 1/II.) illetve az ALL-BFM 1990, 1995 protokoll HR betegek esetében a reintenzifikációs fázis (Protocol 2/II.) első kétheti citarabin kezelést követően fellépő mellékhatásokat. A betegek egységesen 8 alkalommal 75 mg/m^2 dózisban kaptak intravénás citarabint, emellett folyamatosan részesültek napi 60 mg/m^2 merkaptopurin/tioguanin per os kezelésben. A kezelés alatt egy alkalommal intratekális metotrexátot adtunk. A mellékhatásokat a következő ara-C blokkig, ennek hiányában a toxicitási markerek (leukopénia, trombocitopénia, anémia, vese- és májtoxicitás, encefalopátia és infekció) rendeződéséig követtük nyomon. A vizsgált értékeket a beteg írásos kórdokumentációjából gyűjtöttük. A mellékhatások súlyosságának megítélése a Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE) alapján történt. Az 5 éves eseménymentes túlélés (EFS) a diagnózistól az első relapszus megjelenéséig számoltuk. A EFS és össz túlélési (OS) adatok az Országos Gyermektumor Regiszter adatbázisából származnak.

SNP kiválasztás

Öt gén nyolc SNP-jére esett választásunk: *CDA* rs1048977 (C111T), *DCK* rs12648166 (A9846G) és rs4694362 (C1205T), *DCTD* rs4742 (T47C), *SLC28A3* rs7853758 (C69T) és rs7867504 (A25G) és *SLC29A1* rs9394992 (C913T) és rs324148 (T549C). A kiválasztás szempontjai a következők voltak: (i) a minor allélfrekvencia meghaladja a 10%-ot a kaukázusi népcsoportban; (ii) legyen szinonim vagy intron SNP; és (iii) korábbi vizsgálatokban kimutatott összefüggés az SNP és toxicitás illetve túlélés között.

DNS extrakció

Remisszió ideje alatt gyűjtött perifériás vérből származó DNS mintákat vizsgáltunk. A mintagyűjtést megelőzően elhalálozott gyermekek esetében megőrzött csontvelő-kenetekből izoláltuk a DNS-t. Az izolálást High Pure PCR Template Preparation Kit-tel végeztük.

Genotipizálás

Az SNP-k genotipizálását fluoreszcens alapú specifikus KASP próbával végeztük. Technikai kontrollként ismert genotípusú mintákat használtunk.

Statisztikai módszerek

A Hardy-Weinberg egyenlőség meglétének ellenőrzésére a genotípusmegoszlásban és az allélmegoszlásban on-line χ^2 -alkalmazással: szignifikáns eltérés $p < 0,05$ érték esetén állapítottunk meg. Az egyes polimorfizmusok toxicitás rizikót befolyásoló hatásának becsléséhez egyváltozós és többváltozós logisztikus regressziós modellt használtunk az odds ratio (OR) és ennek 95%-os konfidencia intervallumának (95% CI) meghatározására. A genetikai hátternek a vérkép egyes paramétereire gyakorolt hatását többszörösen illesztett generalizált lineáris modellel mértük fel. A nemet (férfi/nő) és a diagnóziskori életkort (évek) vettük be a modellbe kofaktorként. A három genotípus csoportot akkor elemeztük külön, ha minden csoportban elégséges volt a betegszám ($n > 5$). Bonferroni korrekciót alkalmaztunk a többváltozós tesztelés problémájának kiküszöbölésére, a 8 SNP-vel korrigáltunk ($p < 0,00625$ értéket tekintettük a szignifikanciahatárnak). Haploview 4.1 szoftverrel határoztuk meg az esetek és a kontrollok haplotípus frekvenciáit és a kapcsoltsági egyenlőtlenséget (linkage disequilibrium), ez utóbbit a D' és r^2 értékekkel jellemeztük. Haplotípus blokkot azoknál a géneknél határoztunk meg, amikben legalább két SNP-t vizsgáltunk (*DCK*, *SLC28A3*, *SLC29A1*). Logisztikus regresszióval határoztuk meg a haplotípus-specifikus odds ratio-t. A túlélés vizsgálatához Kaplan-Meier módszert használtunk. A statisztikai elemzést IBM SPSS Statistics 21 és a MedCalc 10.0.2.0 szoftverekkel végeztük.

2. Rothmund-Thomson szindróma

Betegünk multiplex fejlődési rendellenességgel született: palatoschisis, csonteltérések (kétoldali radius aplázia, hipopláziás hüvelykujj, dongaláb), ektópiás vese volt jelen. Később fogfejlődési rendellenesség, növekedési elmaradás, a koponyacsontok csontosodási zavara, nyeregorr orr, arcdizmorfia, gyér hajzat és szemöldök, emellett fényérzékenység és mentális retardáció vált megfigyelhetővé. Féléves korában poikilodermatózus elváltozás jelentkezett az arcán és combjain, ekkor derült diagnosztizálása RTS-e. Kontrollra visszahívtuk és felhívtuk a szülők figyelmét a fokozott fényvédelemre a bőrtumorok megelőzése céljából. A gyermek ellenőrzésre nem jött, fokozott fényvédelmet nem alkalmaztak nála. A kislányt három és fél éves korában fejlődéselmaradás miatt hozták ismételt klinikánkra. Felvételekor combján három kerek, hat cm legnagyobb átmérőjű fájdalmas fekély volt jelen, amit megelőzően a bőrgyógyászati ambulancián sikertelenül kezeltek pyoderma gangrenosum diagnózissal. Emellett jobb orrszárnán érzékeny, hiperémiás, tömött duzzanat, karján vörös papulák voltak észlelhetők.

3. Rubinstein-Taybi szindróma

A beteg 3 hónapos korában került klinikánkra enyhe hepatomegália, kétoldali rejtett heréjűség, inspiratorikus stridor, pes equinovarus, trichosis és arcdizmorfia (epicanthus, homlokra húzódó haj, alacsonyan ülő fülek) tüneteivel. Emelkedett ammónia-, laktát- és májenzimszintek miatt kezdetben hiperammoniémia és laktátacidózis, a külső jegyek alapján Cornelia de Lange szindróma gyanúja merült fel. Rendszeresen járt kontrollra. Három éves korára a fiúnak a mikrokefáliája, széles orrnyerge, orchidopexiája és beszédfejlődésének elmaradása markánsná vált. Gyakori felső légúti infekciók jelentkeztek következményes halláscsökkenéssel. Négy éves korára brachydactyliája, széles hüvelykujja és nagylábujja kifejezetté vált, emellett gótikus szájpád, előugró orr, antimongoloid szemrés vált megfigyelhetővé. A gyermek ekkor még nem járt egyedül, mentálisan elmaradott volt. A tünetek alapján Rubinstein-Taybi szindrómát diagnosztizáltunk, *CREBBP* és *EP300* analízist végeztünk. Tekintettel az RSTS-ben fennálló fokozott agytumorhajlamra, koponya MRI vizsgálat történt. Két, asztrocitómának imponáló terime ábrázolódott. Öt hónappal később ataxia és hányás jelentkezett, az egyik lézió megnagyobbodása, liquorstop igazolódott.

EREDMÉNYEK

1. Ara-C farmakolgenetikai vizsgálat

Genotípus és allél-frekvencia

A 8 vizsgált SNP genotípusainak és a minor alléljainak gyakoriságát a **1. táblázatban** mutatjuk be. A genotípusmegoszlás mindegyik SNP-re Hardy-Weinberg egyensúlyban volt.

1. táblázat. SNP-k genotípus- és allélmegoszlása a vizsgált betegpopulációban

Gén	rs-szám	Kr.	Funkció	MAF	Genotípus (%)		
					11	12	22
<i>CDA</i>	rs1048977	1p36.2	Thr145Thr	T (0.31)	70 (50)	51 (37)	18 (13)
<i>DCK</i>	rs12648166	4q13.3	intron	A (0.40)	48 (36)	67 (50)	20 (15)
	rs4694362		intron	C (0.40)	49 (36)	66 (49)	21 (15)
<i>DCDT</i>	rs4742	4q35.1	Val116Val	C (0.30)	69 (51)	52 (38)	15 (11)
<i>SLC28A3</i>	rs7867504	9q21.3	Thr89Thr	C (0.31)	60 (45)	64 (48)	9 (7)
<i>SLC29A1</i>	rs7853758		Leu461Leu	A (0.13)	102 (77)	28 (21)	3 (2)
	rs324148	6p21.1	intron	T (0.21)	83 (61)	48 (35)	5 (4)
	rs9394992		intron	T (0.30)	68 (49)	59 (42)	13 (9)

Kr: kromoszóma, MAF minor allél frekvencia, SNP single nucleotide polymorphism

Összefüggés az SNP-k és a toxicitások között

Beteganyagunkban vizsgáltuk a kialakult leukopéniát, trombocitopéniát, anémiát, a vese- és májtoxicitást, encefalopátiát és a fellépő fertőzéseket. Májkárosodást három esetben észleltünk, de mindhárom alkalommal hepatotróp vírus igazolódott kórokként. Vesekárosodást nem tapasztaltunk. Egy páciensnél alakult ki ara-C asszociált encefalopátia. Az alacsony előfordulás miatt ez az értékeket a genotípusok összefüggésében értékelni nem tudtuk. Elemeztük a leukopénia, trombocitopénia, anémia és infekciók megjelenése és a polimorfizmusok allél- és genotípusgyakoriságának összefüggését. A *DCK* gén két SNP-je szoros asszociációt mutatott a leukopéniával. Az rs12648166 G és rs4694362 T alléleket hordozó betegekben nagyobb volt az esély grade. 3/4 leukopénia kialakulására (OR=2.25, 95% CI=1.27-3.99, $p=0.005$; és OR=2.24, 95% CI=1.26-3.97, $p=0.0053$). Vizsgálva a genotípus eloszlást a *DCK* rs12648166 GG genotípus esetén gyakoribb volt a súlyos leukopénia kialakulása, mint AA genotípus esetén (41% vs. 12%) (OR=2.63, 95% CI=1.37-5.04, $p=0.0036$) illetve *DCK* rs4694362 TT genotípusú betegek fogékonyabbak voltak a grade 3/4 súlyos leukopéniára, mint a CC genotípusúak (42 vs. 12%) (OR=2.53, 95% CI=1.34-4.80, $p=0.0044$). Nem találtunk összefüggést sem a

trombocitopénia és egyéb vizsgált toxicitás, sem a többi elemzett polimorfizmusok esetében. (2. táblázat)

2. táblázat. A genotípusok összefüggése a leukopéniával és trombocitopéniával

Gén	SNP	Grade III/IV leukopénia az intenzifikációs fázis első két hetében						Grade III/IV trombocitopénia az intenzifikációs fázis első két hetében					
		Univariáns eredmény			Multivariáns eredmény			Univariáns eredmény			Multivariáns eredmény		
		p érték	OR	(CI 95%)	p érték	OR	(CI 95%)	p érték	OR	(CI 95%)	p érték	OR	(CI 95%)
<i>CDA</i>	rs1048977	0.76	1.10	0.60-1.99	0.75	1.11	0.60-2.04	0.53	1.19	0.68-2.09	0.67	1.13	0.64-2.01
<i>DCK</i>	rs12648166	0.0035	2.63	1.38-5.04	0.0036	2.63	1.37-5.04	0.30	1.36	0.76-2.43	0.28	1.39	0.77-2.49
	rs4694362	0.0041	2.55	1.35-4.81	0.0044	2.53	1.34-4.80	0.53	1.20	0.69-2.08	0.49	1.22	0.70-2.13
<i>DCTD</i>	rs4742	0.84	0.94	0.51-1.73	0.90	0.96	0.52-1.78	0.81	0.93	0.53-1.66	0.86	0.95	0.53-1.70
	rs7853758	0.03	2.29	1.06-4.92	0.02	2.61	1.17-5.84	0.59	1.27	0.54-3.02	0.45	1.43	0.57-3.61
<i>SLC28A3</i>	rs7867504	0.22	1.53	0.78-3.01	0.19	1.59	0.79-3.19	0.55	1.22	0.63-2.38	0.43	1.32	0.67-2.61
	rs324148	0.90	1.05	0.51-2.16	0.97	1.01	0.49-2.09	0.20	1.64	0.78-3.46	0.23	1.59	0.75-3.37
	rs9394992	0.47	0.79	0.42-1.50	0.44	0.78	0.41-1.48	0.25	0.71	0.40-1.26	0.17	0.67	0.37-1.19

OR: odds ratio, CI: confidence interval

Összefüggés a haplotípusok és a toxicitások között

Haplotípus analízist végeztünk azoknál a géneknél, ahol több polimorfizmust vizsgáltunk, hogy meghatározzuk a haplotípus blokkok és az ara-C toxicitása közötti kapcsolatot. Míg a GT haplotípus nagyobb kockázatot jelentett grade 3/4 leukopénia kialakulására a többi haplotípusnál (65% vs. 43%; OR=2.37, 95% CI=1.34-4.21, $p=0.0031$), az AC haplotípus kisebb kockázattal járt grade 3/4 súlyosságú leukopénia kialakulása szempontjából, mint a többi haplotípus. (35% vs. 57%; OR=0.41, 95% CI=0.23-0.73, $p=0.0025$). A többi vizsgált haplotípus nem mutatott összefüggést a mellékhatások gyakoriságával. (3. táblázat)

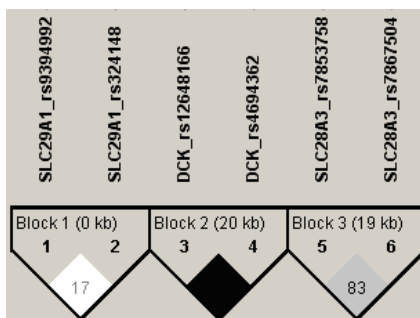
3. táblázat. A haplotípusok összefüggése a leukopéniával és trombocitopéniával

Gén	SNP	Haplotípus	Leukopénia az intenzifikációs fázis első két hetében					Trombocitopénia az intenzifikációs fázis első két hetében				
			Grade 1/2	Grade 3/4	OR	95% CI	p érték	Grade 1/2	Grade 3/4	OR	95% CI	p érték
<i>DCK</i>	rs12648166 –	AC	57%	35%	0.41	0.23-0.73	0.0025	59%	64%	1.18	0.69-2.03	0.55
		GT	43%	65%	2.37	1.34-4.21	0.0031	40%	37%	0.86	0.50-1.49	0.60
<i>SLC28A3</i>	rs7853758 –	GT	59%	70%	1.66	0.93-2.97	0.09	66%	73%	1.35	0.76-2.41	0.31
		GC	19%	20%	1.02	0.50-2.08	0.95	21%	16%	0.73	0.36-1.48	0.39
		AC	18%	10%	0.49	0.22-1.09	0.08	12%	12%	1.02	0.45-2.30	0.96
<i>SLC29A1</i>	rs9394992 –	AT	4%	–	–	–	–	2%	–	–	–	–
		CC	52%	53%	1.14	0.65-1.98	0.65	53%	54%	1.04	0.62-1.77	0.88
		TC	25%	25%	0.95	0.49-1.80	0.87	23%	30%	1.43	0.79-2.57	0.23
		CT	22%	15%	0.59	0.29-1.19	0.14	19%	9%	0.43	0.19-1.02	0.06
		TT	–	7%	–	–	–	5%	7%	1.68	0.59-4.79	0.33

OR: odds ratio, CI: confidence interval

Az allélek közötti kapcsoltságot (linkage disequilibrium koeficiensek: D' és r^2) szintén kiszámoltuk. Erős kapcsoltság igazolódott a *DCK* gén két vizsgált SNP-je (rs12648166 and rs4694362) között ($D'=1$, $r^2=0.98$), míg az *SLC28A3* és *SLC29A1* gén haplotípusai között a kapcsoltság gyenge volt, vagy nem kimutatható ($D'=0.83$, $r^2=0.23$ és $D'=0.17$, $r^2=0.01$). (1. ábra)

1. ábra. Kapcsoltsági analízis



A párok kapcsoltsági foka, mint r^2 és D' (mindkettő 0-1) van feltüntetve. r^2 értékét a színezett felületek jelzik, ahol a sötétedés mértéke reprezentálja a magasabb kapcsoltsági fokot. ($r^2 = 0$ fehér, $0 < r^2 < 1$ szürke, $r^2 = 1$ fekete). $D' \times 100$ számokkal van jelezve $D' < 1$ esetén. *DCK*: deoxicitidin kináz, *SLC28A3*: solute carrier family 28 member 3, *SLC29A1*: solute carrier family 29 member 1

Túlélés. Összefüggés a genotípusok és a túlélés között

A vizsgált betegpopulációban az 5 éves össztúlélés 87.1%-nak, az 5 éves eseménymentes túlélés 83.5%-nak bizonyult, mely megfelel a Magyarországon tapasztalt össztúlélési adatoknak. Tanulmányunkban nem igazolódott hatása a vizsgált polimorfizmusoknak a túlélésre.

2. Rothmund-Thomson szindróma

A nazális elváltozásból vett biopsziás minta bifenotípusú, biklonális, Epstein-Barr vírus-asszociált kután limfómát igazolt.

A beteg terápiáját az „NHL BFM SR non-Hodgkin lymphoma protocol”-nak megfelelően indítottuk. A kezelés kezdetén centrális vénás katéter került behelyezésre. A gyermek bőrelváltozásai két héten belül javulást mutattak. A citosztatikus kezelés harmadik hetében, a kielégítő általános állapotban lévő kislány otthonában hirtelen elhunyt. Halála hátterében a mélyvénás katéter és a sinus sagittalis superior trombózisa igazolódott.

3. Rubinstein-Taybi szindróma

Azonosítottunk egy heterozigóta de novo *CREBBP* nonsense mutációt (NM_004380.2:c.2206C>T), melyet korábban még nem írtak le az irodalomban.

Az észlelt agytumor szubtotálisan el lett távolítva, szövettanilag grade IV. medulloblasztóma igazolódott fokális neurális differenciációval és kalcifikációval, mely a tumor régóta való fennállására utalt.

A kemo- és radioterápiát a „Magyar Agytumor Protokoll MBL2008 HR szubtotálisan rezekált” ága szerint végeztük. A terápia befejezése óta három év telt el, a beteg panaszmentes, rendszeresen jár kontrollra.

MEGBESZÉLÉS

1. Ara-C farmakogenetikai vizsgálat

Bár a jelenleg alkalmazott kemoterápia akut limfoid leukémiás gyermekeknél jó hatásfokú, nem hagyhatjuk figyelmen kívül a terápia súlyos mellékhatásait. Ebben a vizsgálatban a kemoterápia fontos részét alkotó citarabin metabolizmusában részt vevő 5 gén összesen 8 SNP-jének a hatását vizsgáltuk a toxicitásra (leukopénia, trombocitopénia, anémia és infekció) és a túlélésre. Összefüggést találtunk a *DCK* gén két SNP-je, az rs12648166 és az rs4694362 polimorfizmusai és az ara-C adását követően kialakult leukopénia mértéke között allél, genotípus és haplotípus szinten egyaránt. Nem találtunk összefüggést sem a trombocitopénia és egyéb vizsgált toxicitás, sem a túlélés, sem a többi elemzett polimorfizmusok esetében.

Számos tanulmány számolt már be a genetikai háttér toxicitást és terápiás választ befolyásoló hatásáról, de csak néhány foglalkozott az általunk is vizsgált *DCK* SNP-kel (rs12648166 és rs4694362). Felnőtt szolid tumoros gemcitabinnal kezelt betegekkel történt vizsgálatok során Tanaka igazolta a *DCK* rs4694362 polimorfizmus TT genotípusának és a neutropénia kialakulásának összefüggését, de nem talált asszociációt a *DCK* rs12648166 esetében. Okazaki szintén ebben a populációban ugyanezeket az SNP-ket tanulmányozva csak az rs4694362T allélt találta a neutropénia kockázati tényezőjének. Az rs4694362 TT ezen túl szignifikáns prognosztikus faktornak bizonyult AML-es betegek túlélésében (Kim).

Integrálva és továbbfejlesztve ismereteinket az SNP-k hatásáról napjaink ALL terápiájába újabb lehetőségünk nyílna a mellékhatások csökkentésére, ezáltal a túlélés további javulására.

2. Ritka genetikai megbetegedések malignizálódási hajlammal

Rothmund-Thomson szindróma

Bár a rosszindulatú elváltozások gyakoriak RTS-ben, limfómával ritkán találkozunk. Az általunk bemutatott beteg az első az irodalomban, akinél bifenotípusú, biklonális kután limfóma jelentkezett. Más típusú limfóma kialakulása sem jellemző ebben a korai életszakaszban.

Betegünk nem jelent meg a megbeszélte kontroll vizsgálaton és fokozott fényvédelmet sem alkalmaztak nála. A combjain kialakuló léziókat nem megfelelő diagnózis alapján kezelték. A fényvédelem hiánya szerepet játszhatott a malignitás kialakulásában, és egy korai diagnózis lehetséges, hogy egy kevésbé agresszív kezelést is megengedett volna.

RTS esetén a fokozott fényvédelem nélkülözhetetlen, hogy csökkentsük a bőrtumorok kialakulásának valószínűségét. Félévente szakorvosi (bőrgyógyászati/

genetika) ellenőrzés, a meglévő problémák egyensúlyban tartása, a megjelenő új tünetek, különösen a daganatkialakulás jeleinek korai felismerése rendkívül fontos, kiegészítve a beteg állapotának és várható szervkárosodásának megfelelő konzíliumokkal (szemészet, endokrinológia, ortopédia, fogászat). Gyógytornász, fejlesztő pedagógus segítsége is igénybe veendő. Genetikai vizsgálat javasolt bizonytalan diagnózis, célzott családtervezés esetén.

Rubinstein-Taybi szindróma

Bár betegünknel születéskor még nem volt diagnózis felállítható, köszönhetően a rendszeres utánkövetésnek, a szülő jó compliance-ének, az újabb, karakterisztikus tünetek megjelenésével az RSTS megállapíthatóvá vált. Ismerve a betegség agytumorra való fokozott hajlamát, rutin koponya MRI vizsgálat történt, ami már igen korai stádiumban felfedte a gyermek tumorát. Szubtotális tumoreltávolítást, kemoterápiát követően, a beteg már 3 éve tünetmentes, rendszeresen jár kontrollra.

Felmerül a lehetősége, hogy a betegség hátterében azonosított *CREBBP* variáns tumor- predisponáló szereppel bír, a mutáció igazolódása további betegeknel medulloblastoma várható megjelenésére figyelmeztethet.

RSTS fennálltakor félvénykenti szakorvosi (genetika) vizit ajánlott, emellett bőrgyógyász, szemész, pulmonológus, kardiológus, fogász, ortopédus, endokrinológus és más szakember segítségére is szükség lehet. Fizioterápia, fejlesztő oktatásra lehet igény. A leggyakrabban előforduló tumorokra – keloid, agytumorkok vérképzőszervi daganatok – való fokozott figyelem elengedhetetlen, évente koponya MRI vizsgálat, félévente vérképpenőrzés javasolt. Genetikai vizsgálat segíthet a diagnózis felállításában, a rákhajlam és a prognózis pontosabb meghatározásában, a családtervezésben.

Diagnózis és gondozás tumorra hajlamosító ritka genetikai szindróma esetén

A malignitási hajlammal járó örökletes megbetegedések megfelelő gondozása rendkívül fontos. A pontos, korai diagnózis lehetővé teszi a prediktív orvoslást: célzott gondozást a várható kimenetel tükrében. A genetikai háttér kimutatása nem csak a kétes diagnózisok esetén segítség, pontosítja a prognózist, előrejelezhető, milyen malignitásokra különösen nagy a fogékonyág. Szerepe lehet a családtervezésben is. A gondos utánkövetés (anamnézis, fizikai és képalkotó vizsgálatok) elengedhetetlen, kitüntetett figyelemmel a potenciális tumor kezdeti tüneteire. A korai tumordiagnózis jelentősen javíthatja a prognózist.

Záró gondolatként néhány, a diagnosztikai buktatók elkerülését és a betegkövetés javítását elősegítendő lehetőségre szeretném felhívni a figyelmet:

1. A genetikai szindrómák malignitásra való hajlamának hangsúlyozása az orvosképzésben (elsősorban gyermek és háziorvosok részére): a korai jelek észlelése, a beteg megfelelő szakorvoshoz való irányításának hangsúlyozása.
2. Protokollok alkalmazása a betegkövetésben.
3. A szülő oktatása: részletes, a szülő számára érthető tájékoztatás a betegségről, annak várható tüneteiről és kimenetelésről, a daganatok és életveszélyes szövödmények kialakulásának kockázatáról és a surveillance fontosságáról. Tájékoztató füzetek összeállítása segíthetné ezt a munkát.

AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Elsőként vizsgáltuk gyermekkori akut limfoid leukémiában a következő SNP-ket és az ara-C toxicitás és túlélés összefüggését: *CDA* rs1048977, *DCK* rs12648166 és rs4694362, *DCTD* rs4742, *SLC28A3* rs7853758 és rs7867504 és *SLC29A1* rs9394992 és rs324148.
2. Összefüggést igazoltunk a *DCK* gén két SNP-je, az rs12648166 és rs4694362 polimorfizmusok és az ara-C mellékhatásaként fellépő leukopénia között allél, genotípus és fenotípus szinten egyaránt. Nem igazoltunk összefüggést sem a többi vizsgált SNP és a leukopénia, sem bármely vizsgált SNP és az egyéb mellékhatások – trombocitopénia, anémia, fertőzések – illetve a túlélés között.
3. Elsőként mutattunk be Rothmund-Thomson szindrómához társuló bifenotípusú, biklonális, EBV-hez társult limfómát. Emellett ebben a korai, 3 éves életkorban korábban nem írtak még le RTS-hez társuló limfómát.
4. Új *CREBBP* nonsense mutációt (NM_004380.2:c.2206C>T) azonosítottunk a Rubinstein-Taybi szindróma hátterében.

KONKLÚZIÓK

1. A *DCK* gén rs12648166 és rs4694362 SNP-k és az ara-C mellékhatásaként fellépő leukopénia közötti összefüggés igazolása segítséget nyújthat a citarabin toxicitás jobb megértéséhez és a gyermekkori akut limfoid terápia individualizálásához.
2. Alakulhat ki Rothmund-Thomson szindrómához társulva bifenotípusú, biklonális, EBV-hez társult limfóma. Már igen korai, 3 éves korban is társulhat RTS-hez limfóma.
3. Tekintettel a kialakult medulloblastomára, felmerül a lehetősége, hogy az újonnan azonosított *CREBBP* mutáció a Rubinstein-Taybi daganatra, ezen belül medulloblastomára hajlamostító génelváltozásai közé tartozzon.
4. Esetbemutatusaink alátámasztják a malignitási hajlammal járó öröklődő betegségek esetén a korai diagnózis és a prediktív orvoslást fontosságát. A megfelelő gondozás, profilaxis és terápia lehetővé teheti a rákkockázat csökkentését, a tumor korai felismerését, a jobb életminőséget és a prognózis javítását. A genetikai diagnózis felállítása segít a betegség azonosításában, a tumorkockázat pontosításában, az utánpótlásban és emellett családtervezést tehet lehetővé.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretettel és hálával köszönöm dr. Bartyik Katalin tanárnőnek, hogy magával ragadott engem a gyermek hematoológia szakma szépségeibe, elindított a kutatás kezdeti lépésein és mindvégig támogatott. Nagyon köszönöm dr. Andrewffy Emőke tanárnőnek a témaválasztás elősegítését, és különösen hálás vagyok dr. Erdélyi Dánielnek a kutatás témájának kidolgozásában és megvalósításában nyújtott segítségével, és az általa korábban gyűjtött minták felhasználásának lehetőségéért. Hálás köszönet dr. Semsei Áginak, kinek tudása és segítőkészsége nélkülözhetetlen volt az eredmények végső formába való öntéséhez. Szeretnék köszönetet mondani dr. Szalai Csaba professzor úrnak, hogy befogadta csoportjába a kutatástervem, emellett anyagi háttérrel is biztosított. Nagyon köszönöm a segítségét és a hasznos tanácsokat dr. Bereczki Csaba tanár úrnak és a munkám kezdetén nyújtott támogatást dr. Túri Sándor professzor úrnak.

Köszönetet mondok minden társszerzőmnek és munkatársamnak, akik segítettek a laboratóriumi és klinikai munkámat, különösen dr. Schermann Gézának, dr. Lautner-Csorba Orsolyának, Rárosi Ferencnek, dr. Berek Krisztinának, dr. Karg Eszter tanárnőnek, dr. Papp Ferencknek, dr. Kalmár Tibornak, dr. Maróti Zoltánnak, dr. Németh Istvánnak, dr. Iványi Béla professzor úrnak és Balla Ferencné Zsuzsának. Köszönet a Szegedi Tudományegyetem Gyermekonkológiai Osztálya és Laboratóriuma, a Semmelweis Orvostudományi Egyetem II. sz. Gyermekklinika, a Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézetének a munkám során segítséget nyújtó minden asszisztensének, nővérének és orvosának.

Köszönettel tartozom dr. Jakab Zsuzsának és a Magyar Gyermekrák Regiszternek a betegtulélési adatokért, és dr. Hajdú Ildikónak az ábrakészítésben nyújtott segítségéért.

És nem utolsósorban hálás vagyok a Reménysugár a Dél-alföldi Hematológiai és Onkológiai Gyermekbetegekért Alapítványnak az anyagi támogatásért. Emellett köszönet illeti alábbi támogatókat: NKTH (National Research and Technology) TECH_08-A1/2-2008-0120: (C Szalai, P Antal); OTKA (Hungarian Scientific Research Fund): PD 109200 (ÁF Semsei).

És különösképp köszönöm és hálás vagyok a családomnak, kiknek szeretete, támogatása, biztatása és türelme nélkül nem valósulhatott volna meg ez a munka.

KÖZLEMÉNYEK

A tézis alapjául szolgáló közlemények

1. Gabor KM, Schermann G, Lautner-Csorba O, Rarosi F, Erdelyi DJ, Endreffy E, Berek K, Bartyik K, Bereczki C, Szalai C, Semsei AF: Impact of single nucleotide polymorphisms of cytarabine metabolic genes on drug toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* 2015;62(4):622-8 doi: 10.1002/pbc.25379 [PubMed :25557962]. **IF:2.562**
2. Bartyik, KM. Gabor KM, Iványi B, Németh I, Karg E: Rothmund-thomson syndrome and cutan T-cell lymphoma in childhood. *Open Journal of Pediatrics*, 2013;3:270-273

A tézis témájához kapcsolódó közlemények

1. Kutszegi N, Semsei ÁF, Gézsi A, Sági JC, Nagy V, Csordás K, Jakab Z, Lautner-Csorba O, Gábor KM, Kovács GT, Erdélyi DJ, Szalai C, 2015. Subgroups of Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia Might Differ Significantly in Genetic Predisposition to Asparaginase Hypersensitivity. *PLoS One* 10(10):e0140136. doi: 10.1371/journal.pone.0140136. [PubMed 26457809]. **IF: 3.234**

Egyéb közlemények

1. Gábor Krisztina; Antal Andrea; Dibó György; Kéri Szabolcs; Janka Zoltán; Vécsei László; Benedek György Eseményfüggő potenciálok vizsgálata Parkinson-kórban és essentialis tremorban. *Ideggyógyászati Szemle*, 1999;52(7-8):289-293.
2. Antal A, Dibo G, Keri S, Gabor K, Janka Z, Vecsei L, Benedek G. P300 component of visual event-related potentials distinguishes patients with idiopathic parkinson's disease from patients with essential tremor. *J Neural Transm*. 2000;107:787–797. [PubMed: 11005544]. **IF: 1.785**
3. Müller Judit, Koós Rozália, Garami Miklós, Hauser Péter, Borgulya Gábor, Schuler Dezső, Benyó Gábor, Magyarosy Edina, Galántai Ilona, Milei Krisztina, Török Katalin, Bárdi Edit, Hunyadi Katalin, Gábor Krisztina, Masáth Péter, Bodnár László, a Magyar Gyermekonkológiai Hálózat és Kovács Gábor: Gyermekkori Langerhans-sejtes histiocytosisal szerzett magyarországi tapasztalataink. *Hungarian Oncology*; 2004;48:289-295.